تولید ماست تقویت شده با گاما آمینوبوتیریک اسید به کمک *لاکتوباسیلوس ساکئی* و عصاره مالت برنج قهوه ای

نفیسه جعفری[1]، سولماز صارم نژاد[1*]

1- گروه علوم و صنایع غذایی،دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،ایران

(تاریخ دریافت: 98/01/29 تاریخ پذیرش: 98/10/02)

چکیده

گاماآمینوبوتیریک اسید یا گابا نوعی آمینواسید غیر پروتئینی با خواص فراسودمند است. این ماده یک انتقال دهنده عصبی مهارکننده است که در تنظیم فعالیتهای قلبی عروقی مثل فشارخون وریتم قلب، احساس درد و هیجان، تحریک ترشح انسولین از پانکراس و پیشگیری از بروز دیابت نقش دارد.از تکنیک های بیوسنتزگابا، تخمیر توسط برخی ریزسازواره ها و فرایند جوانه زدن دانه غلاتاست. هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان تولید ماست تقویت شده با گابا به کمک *لاکتوباسیلوس ساکئی* و عصاره مالت برنج قهوه ای بود. به این منظور عصاره مالت برنج قهوه ای در مقادیر0، 50، 75 و 100 میلی لیتر به شیر کم چرب اضافه و پس از تلقیح کشت آغاز گر تجاری ماست و *لاکتوباسیلوس ساکئی*ماست قالبی تولید شد، سپس میزان گابا، ترکیبات فنولی ، ظرفیت آنتی اکسیدانی، مقدار آمینو اسیدهای آزاد و ویژگی های حسی ارزیابی شدند.

بر اساس نتایج، ماست های تهیه شده با عصاره مالت برنج قهوه ای حاوی گابا بودند، بیشترین میزان(5/62 میلی گرم درصد گرم ماده خشک) در ماست حاوی100میلی لیتر از عصاره مالت برنج قهوه ای مشاهده شد. استفاده از عصاره مالت برنج قهوه ای و *لاکتوباسیلوس ساکئی*در تهیه ماست سبب افزایش معنی دار($p\leq0/05$) ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی آنها نسبت به شاهد شد. در بررسی پروفایل آمینواسید، گلوتامیک اسید دارای بیشترین غلظت و لیزین بیشترین مقدار آمینواسیدهای ضروری را به خود اختصاص داد. در ارزیابی حسی، بیشترین میزان پذیرش کلی مربوط به نمونه حاوی 50 میلی لیتر عصاره مالت برنج قهوه ای بود. باتوجه به نتایج، تولید ماست فراسودمند تقویت شده با گابا و حاوی ترکیبات فنولی و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از عصاره مالت برنج قهوه ای و تخمیر بلاکتو*باسیلوس ساکئی*وکشت های آغاز گر معمول ماست امکان پذیر است.

کلید واژگان: ماست، فراسودمند، گاما آمینوبوتیریک اسید،*لاکتوباسیلوس ساکئی*، مالت برنج قهوهای

*مسئول مکاتبات:solmazsaremi@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

1- مقدمه

ماست محصولی تخمیری و حاصل فعالیت باکتری‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس* بر شیر است [1]. از سوی دیگر گاما آمینو بوتیریک اسید[1] نوعی آمینواسید غیر پروتئینی چهار کربنه منحصر به فرد است که در اثر دکربوکسیلاسیون گلوتامیک اسید و با عمل کاتالیزوری آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز[2] تولید می‌شود [1و2]. امروزه گابا به عنوان یک ترکیب مؤثر در صنایع داروسازی و ماده زیست فعال در فرمول برخی مواد غذایی فراسودمندبه کار میرود [2]. این ترکیب در تنظیم فشارخون و ریتم قلب و کنترل احساس درد و هیجان، درمان اختلالات عصبی و کاهش علایم آلزایمر بسیار مؤثر است، سبب تحریک ترشح انسولین از پانکراس شده و در تنظیم هورمون رشد و بهبود سنتز پروتئین‌های مغز نیز نقش دارد [1-5]. مصرف غذاهای تقویت‌شده باگابا مثل شیر [1و6]، سویا [1و7] و تمپه[3] [8] در ممانعت از افزایش فشارخون سیستولیک موش موثر گزارش شده است.گزارشاتی نیز مبنی بر جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی و بهبود قدرت حافظه و توانایی یادگیری در افراد در اثر مصرف مواد غذایی حاوی گاباوجود دارد[9]. گابا دارای قابلیت تولید به صورت شیمیایی یا بیولوژیکیاست که البته استفاده از تکنیکهای بیوسنتزی از جمله تخمیر اخیرا در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. شرایط تخمیر می‌تواند با تأثیر بر ویژگی‌های بیوشیمیایی گلوتامات دکربوکسیلازریز سازواره های تخمیرکننده باعث بهینه‌سازی تولید گابا شود [9]. مطالعات محدودی در زمینه تولید گابا در مواد غذایی به ویژه با روش تخمیر صورت پذیرفته است. به طورمثالپارک و اُه درسال 2007 با افزودن کشت آغازگر وعصاره مالت سویا به شیر سویا، ماست سویای حاوی گابا تهیه کردند و غلظت گابا را 424/67 میکروگرم/گرم ماده خشک گزارش نمودند، درحالیکه تخمیر شیر گاو در شرایط مشابه غلظت 1/5 میکروگرم/گرم ماده خشک گابا را در پی داشت. ماست سویای گابا همچنین دارای سطوح قابل‌توجهی آمینواسید آزاد و ایزوفلاون ها در مقایسه با سایر ماست‌های رایج بود [1]. چنو همکاران (2016) به تولید ماست غنی‌شده باگابا توسط تخمیر به کمک *استرپتوکوکوس سالیواریوس* زیرگونه *ترموفیلوس**fmb5* پرداختند وکاهش غلظت کلسترول تام و تری گلیسیرید و افزایش معنی‌دار لیپوپروتئین با دانسیته بالا وانسولین در سرم خون موش‌ها را در اثر مصرف ماست حاوی گابا گزارش نمودند [10]. همچنین گزارشات دیگری مبنی بر تولید گابا توسط تخمیر با باکتریهای لاکتیکی وجود دارد، از آن جمله میتوان به تولید گابا توسط *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* جدا شده از فراوردههای غذایی تخمیری [11]، *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از خمیر ترش با پایه کینوا [13]، تخمیر دانه های جو و لوبیا قرمز با *لاکتوباسیلوس برویس**TISTR860* و تخمیر مخلوط برنج و گندم با *لاکتوباسیلوسپلانتاروم **MNZ*** برای تولید گابا [12و 14] اشاره نمود. تنها مقاله منتشر شده در مورد تولید ماست حاوی گابا با باکتری لاکتیکی تولید گابا در ماست با استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم **NDC 75017*** بوده است. در تحقیق مورد اشاره از منوسدیم گلوتامات به عنوان سوبسترای تولید گابا توسط ریز سازواره و از ترکیب پیریدوکسال 5- فسفات به عنوان کوآنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز استفاده شد و میزان تولید گابا 314/56 میلی گرم بر 100 گرم ماست گزارش شد [15].

یکی از باکتریهای لاکتیکی مجاز به استفاده در صنایع غذایی *لاکتوباسیلوس ساکئی*[4] *می باشد*. این باکتری دارای پتانسیل بیوتکنولوژیک برای محافظت زیستی مواد غذایی است. بیشتر در تخمیر سوسیس خشک بکار می رود. این باکتری در لیست GRAS[5] است و در بهبود ایمنی میکروبی محصولات گوشتی غیر تخمیری نیز نقش دارد.*لاکتوباسیلوس ساکئی*می تواند مانع رشد *اشریشیا کلی* درگوشت چرخ کرده شده و برخی دیگر از سویه های این باکتری دارای اثر بازدارندگی بر *سالمونلا تیفی موریوم* در نوشیدنیهای با پایه برنج تخمیر شده هستند. سوشهای مختلف *لاکتوباسیلوس ساکئی* در انواع مختلف غذاهای تخمیری مثل کلم تخمیری، خمیر ترش و گوشت یافت میشوند. بیشترین کاربرد تجاری این ریزسازواره در کشتهای آغازگر سوسیس تخمیری است. اخیرا توجه به این ریزسازواره به عنوان باکتری پروبیوتیک و محافظ افزایش یافته است [16]. گائو، لی و لیو (2014) قابلیت *لاکتوباسیلوس ساکئی**C2* در تولید باکتریوسین با دامنه وسیع بازدارندگی و پتانسیل پروبیوتیک بودن را گزارش نمودند [17]. چایلو و

1. Gamma amino butyric acid (GABA)
2. Glutamate decarboxylase (GAD)
3. Tempeh

4. *Lactobacillus sakei*
5. Generally Recognized As Safe

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

همکاران (2014) نیز روی اثرات محافظتی *لاکتوباسیلوس ساکئی* روی گوشت چرخ کرده به تحقیق و مطالعه پرداختند [18]. کواینتو، مارین و شافنر (2016) نیز کاهش جمعیت *لیستریا منوسایتوژنز* در سس گوشت در حضور *لاکتوباسیلوس ساکئی MN* را گزارش نمودند [19]. باتوجه به اینکه برنج قهوهای به دلیل وجود ترکیبات مغذی و حضور لایه سبوس محصولی ارزشمند میباشد و فرایند مالت کردنبه طور طبیعی سبب سنتز مقادیری گابا در آن می شود[20] و از سوی دیگر تاکنون تحقیقی در زمینه پتانسیل تولید گابا توسط *لاکتوباسیلوس ساکئی* صورت نپذیرفته و برنج قهوهای از سوبستراهای مناسب این باکتری است،لذا هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر افزودنباکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* و درصدهای مختلف عصاره مالت برنج قهوهای برای اولین باردر کنار کشتهای آغازگر معمول ماستبر میزان گابای تولیدی در ماست قالبی کم چرب می‌باشد.

2- موادوروش‌ها

2-1- مواد مورد استفاده

برنج قهوه ای رقم هاشمی گیلان از موسسه تحقیقات برنج کشور، *لاکتوباسیلوس ساکئی*[1] با PTCC 1712 از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، کشتهای آغازگر ماست و شیر خشک از کارخانجات لبنیات پگاه تهران، آنزیم آلفا آمیلاز از شرکت آرتین شیمی و محیط کشت میکروبی MRS Agarو MRS broth و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان تهیه شد. لازم به ذکر است با توجه به اینکه یکی از سوبستراهای مناسب تخمیر برای باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی*، برنج است و این ریزسازواره روی برنج به خوبی رشد میکند لذا از این باکتری برای تخمیر عصاره برنج قهوه ای و بررسی اثر افزودن این باکتری در سنتز گابا در طی تولید ماست استفاده شد.

2-2-روش تولید آرد مالت برنج قهوه‌ای و پودر عصاره آن

پس از شستشو و ضدعفونی دانه‌های برنج قهوه‌ای با سدیم هیپوکلریت به مدت 30 دقیقه، دانه ها در محلول گلوتامیک اسید 5 میلی مولار در انکوباتور30 درجه سانتیگراد به مدت 24ساعت خیسانده شده و محلول گلوتامیک اسید هر 5-6 ساعت یک بار تعویض شد. دلیل استفاده از گلوتامیک اسید برای خیساندن دانه ها پیش ساز بودن این اسید در سنتز گابا در دانه بود[9]. در ادامه دانه های خیسانده شده، در30 درجه سانتیگراد به مدت 48 ساعت در رطوبت نسبی 95تا100 درصد برای جوانه زنی در گرمخانه قرار داده شدند. دانه‌های جوانه‌زده یا مالت شده در آون 50 درجه سانتیگراد تا رسیدن به رطوبت10%خشک شدند. دانه‌های جوانه زده و خشک شده پس از آسیاب کردن، با الک 40مش الک شدند. جهت تهیه عصاره، آرد مالت تهیه شده با آب مقطر به نسبت 1 به 4 (وزنی/حجمی) مخلوط و پس از استریلیزاسیون در دمای 121°Cو فشار 15psiدر اتوکلاو، دوغاب استریل شده با کاغذ صافی واتمن شماره 42 صاف و محلول صاف شده کدر رنگ به عنوان عصاره مالت برنج قهوه‌ای باخشک کن انجمادی جهت تبدیل به پودر عصاره مالت برنج قهوه‌ای[2] خشک شد. لازم به ذکر است از پودر عصاره مالت برنج قهوه ای صرفا برای اندازه‌گیری خصوصیات شیمیایی آن استفاده شد و برای تولید ماست جهت صرفه جویی در هزینه ها از عصاره مایع مالت برنج قهوه ای بهره گرفته شد.

2-3-اندازه‌گیری خصوصیات شیمیایی پودر عصاره مالت برنج قهوه‌ای

2-3-1- روش استخراج و اندازه گیری میزان ترکیبات فنولی

یک گرم پودر عصاره و 10 میلی لیتر اتانول 80 درصد به مدت 30دقیقه روی همزن مغناطیسی مخلوط و در4000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ شد. 500 میکرولیتر از مایع رویی[3] حاصل از سانتریفیوژ با 2/5 میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتو 2 مولار 5 دقیقه هم زده شد، سپس 2میلی لیتر سدیم کربنات7/5 % (وزنی / حجمی) به آن اضافه شده و مجددا 30 دقیقه دیگر در تاریکی مخلوط شد. میزان جذب نمونه در طول موج 765 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Philler scientific 6100, USA) قرائت گردید.از اتانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد[21]. جهت تبدیل عدد جذب نمونه ها به غلظت ترکیبات فنولی از گالیک اسید به

1. *Lactobacillus sakei*

2. Germinated brown rice (GBR)
3. Supernatant

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

عنوان استاندارد ترکیبات فنولی برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شده و تمامی نتایج بر حسب معادل گالیک اسید[1] اعلام شد.

2-4-روش اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی

100میکرولیتر از مایع رویی حاصل سانتریفوژ حاوی ترکیبات فنولی مرحله قبل به 3/9 میلی لیتر محلول 0/075 میکرو مولاردی پی پی اچ[2] اضافه و یک ساعت در تاریکی مخلوط شد.برای تهیه نمونه کنترل از100 میکرولیتر اتانول استفاده شد. پس از اتمام یک ساعت میزان جذب محلول توسط اسپکتروفتومتر در طول موج515 نانومتر قرائت و از متانول برای صفر کردن دستگاه استفاده شد[22].درصد مهار رادیکال دی پی پی اچ از رابطه 1 محاسبه گشت:

رابطه (1)

= درصد مهار رادیکال دی پی پی اچ

100 × (جذب کنترل/جذب نمونه -1)

2-5-روش اندازه گیری میزان گابا و آمینو اسیدهای آزاد

تعیین مقدار آمینواسیدهای آزاد و گابا بر اساس روش ارائه شده توسط کوله آو همکاران(2016) پس از مشتق سازی نمونه ها توسط ترکیبات تری فلوئورواستیل استربا GC-MS(Thermo Finnigan, Proanalysis, Romaniaدر حالت Electron impact انجام شد [23].

شرایط استخراج آمینواسید از نمونه ها به شرح زیر بود:

رزین تبادل یون Dowex 50W-X8، مش 100، ستون 2 × 40 میلی متر، شرایط فعال سازی رزین: شستشو با 2 میلی لیتر از NH_4OHبا غلظت 3 مولار و سپس تبخیر آن.

شرایط مشتق سازی آمینو اسیدها:

1-استریفیکاسیون با 100 میکرولیتر بوتانول/ کلریدریک اسید 3 مولار به مدت 1 ساعت در110° C

2-انجام فرایند استیلاسیون با 100 میکرولیتر تری فلوئورو استیل استر به مدت 20 دقیقه در 80 °C، خشک کردن در 4°C و افزودن 1 میلی لیتر اتیل استات به نمونه

3-شرایط دستگاه GC:

مشخصات ستون مویین: Rtx- 5 MS, 30 m × 0.25 mm I.D; Film thickness 0. 25 µm, Splitmode (10:1)

برنامه دمایی دستگاه:

50°C به مدت 1 دقیقه،6° C/ min تا 100°C، 4° C/ min تا 200° C، 20° C / min تا 300° C،300° C به مدت 3 دقیقه. گاز حامل هلیم با دبی 1ml/min

2-6-روش کشت باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی*

مقداری از باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* فعال شده روی محیط کشت مادر MRS Agar به 26 میلی لیتر از محیط کشت استریل MRSbroth منتقل گردید و داخل گرمخانه مجهز به همزن[1] به مدت 45 ساعت در دمای 35 ° C گذاشته شد. پس از رشد باکتری برای خالص سازی و آماده نمودن سوسپانسیون میکروبی جهت تلقیح به خمیر ترش، محتویات داخل فالکون (حاوی باکتری و محیط کشت) به مدت 16 دقیقه در 71×g سانتریفوژ گردید (Kobuta 2420, Japan). محیط کشت جمع شده روی فالکون تخلیه شد. برای حذف کامل محیط کشت، به کمک آب مقطر استریل میکروب ها چند بار شسته و سانتریفیوژ شدند، سپس 1 میلی لیتر آب مقطر استریل به محتویات درون فالکون اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، دانسیته نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج600 نانومتر روی 3تنظیم شد [19] که بر اساس شمارش انجام شده دانسیته نوری 3 تقریبا معادل 10^8 CFU/ml از باکتری بود.

لازم به ذکر است با توجه به این که شمارش تعداد باکتری ها به تفکیک هر باکتری فرایندی زمان بر است، لذا از روش دانسیته نوری برای تعیین غلظت باکتری برای سرعت عمل و امکان استفاده از باکتری های تازه و جوان در این کار تحقیقی استفاده شد. برای تبدیل عدد دانسیته نوری به مقدار جمعیت میکروبی، ابتدا رقت های مختلفی از هر باکتری تهیه شده و پس از شمارش تعداد باکتریهای موجود در هر رقت، میزان جذب نور هر رقت در طول موج 436 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر تعیین شد. منحنی کالیبراسیون بر حسب تعداد باکتری در رقت های مختلف در برابر میزان جذب نور آن رسم شد و بر این اساس تعداد باکتریهای موجود در سوسپانسیون میکروبی با دانسیته نوری 3 محاسبه شد.

1. 2 Gallic Acid Equivalent (GAE)
2. 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

1. Shaker incubator

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

2-7-تهیه ماست قالبی[1]

تمام مراحل همانند تهیه ماست قالبی معمولی انجام شد[15]. فرمولاسیون و ترتیب نام گذاری نمونه ها یا تیمارها به شرح زیر است:

تیمار 1: ماست شاهد (شیر کم چرب، پودر شیر خشک، کشت های آغاز گر ماست)

تیمار2 : شیر کم چرب،پودر شیر خشک،کشت های آغاز گر ماست، 50 میلی لیتر عصاره مالت برنج قهوه‌ای، سوسپانسیون باکتری *لاکتوباسیلوسساکئی* (10^8 cfu / ml)و 0/011گرم آلفا آمیلاز

تیمار3: شیر کم چرب، پودر شیر خشک، کشت های آغاز گرماست، 75میلی لیتر عصاره مالت برنج قهوه‌ای، سوسپانسیون باکتری *لاکتوباسیلوسساکئی* (10^8 cfu / ml)و 0/011گرم آلفا آمیلاز

تیمار 4: شیر کم چرب، پودر شیر خشک، کشت های آغاز گر ماست،100 میلی لیتر عصاره مالت برنج قهوه‌ای سوسپانسیون باکتری *لاکتوباسیلوسساکئی* (10^8 cfu / ml) و 0/011 گرم آلفا آمیلاز

تیمار 5: شیر کم چرب، پودر شیر خشک، کشت های آغاز گر ماست، سوسپانسیون باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* (10^8 cfu / ml)

لازم به ذکر است به منظور حفظ میزان ثابت حجم در تولید ماست با تیمارهای متفاوت، به ازای افزودن هر میزان عصاره مالت برنج قهوه ای به همان مقدار از حجم شیر مورد استفاده کم شد.میزان شیر خشک 10% وزن شیر و میزان کشت آغاز گر ماست 400 میکرولیتر به ازای هر 100 میلی لیتر شیر در نظر گرفته شد، همچنین هدف از افزودن آلفا آمیلاز شکسته شدن نشاسته برنج و آزاد شدن مقداری قند جهت تسریع رشد باکتری بود.

2-8- روش استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات فنولی محلول در نمونه های ماست

4 میلی لیتر از هر نمونه ماست همراه 18 میلی لیتر آب مقطردر4000 دور در دقیقه به مدت 15دقیقه سانتریفوژ شد. 500 میکرولیتر از سوپرناتانت با 2/5 میلی لیتر فولین سیوکالتو 2 مولار 5 دقیقه همزده شد، سپس 7/5 میلی لیتر سدیم کربنات 7% (وزنی / حجمی) به آن اضافه شده و به مدت 5 دقیقه در تاریکی روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. پس از قرار دادن مخلوط فوق به مدت 2 ساعت در انکوباتور25°C در تاریکی، جذب نمونه ها در طول موج 765 نانومترقرائت گردید. در نمونه کنترل به جای 500 میکرولیتر نمونه از 500 میکرولیتر آب مقطر استفاده شد[24].

2-9- روش اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماست به روش مهار رادیکال دی پی پی اچ

1000 میکرولیتراز مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ وحاوی ترکیبات فنولی با15 میلی لیتر محلول 0/075میکرومولاردی پی پی اچ مخلوط و پس از نیم ساعت همزدن روی همزن مغناطیسی، 30 دقیقه در تاریکی قرار گرفت،سپس جذب نمونه در 517 نانومتر دراسپکتوفتومتر قرائت شد. جهت تهیه نمونه کنترل به جای نمونه حاوی ترکیبات فنولی ازآب مقطر استفاده شد [24]. درصد مهار رادیکال دی پی پی اچاز رابطه1 محاسبه شد.

2-10- اندازه‌گیری میزان گاباوآمینواسیدهای آزاد ماست

مطابق روش اجرا شده برای پودر عصاره انجام شد.

2-11- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی توسط 20 ارزیاب (10 زن و 10 مرد) با استفاده از روش امتیازدهی هدونیک 5 نقطه ای صورت پذیرفت. شاخص‌های طعم و مزه، بافت، ظاهر، بو، میزان قاشق برداری و در نهایت میزان پذیرش کلی نمونه‌ها توسط پرسشنامه ارزیابی شدند.

2-12- روش آنالیز آماری

طرح آماری مورد استفاده طرح کاملا تصادفی و تجزیه تحلیل داده ها بر مبنای جداول تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و

1. Set yogurt

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

مقایسه میانگین ها با روش دانکن در سطح معنی داری 5 درصد با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه 22 انجام پذیرفت. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند به جز آزمایش تعیین پروفایل آمینو اسید که یک بار انجام شد.

3-نتایج و بحث

3-1-ویژگی های شیمیایی پودر عصاره مالت برنج قهوه ای

نتایج ویژگی های شیمیایی پودر عصاره مالت (جدول1) بیانگر قدرت 44/74 درصدی آنها در مهار رادیکال دی پی پی اچ است.

Table 1 Chemical properties of germinated brown rice powder

Property	Amount
Moisture(g. $100g^{-1}$)	15±0.3
Free phenolics(mg GAE ml^{-1})	0.107±0.0005
Free Antioxidant Activity (%)	44.74±1.41
GABA(mg 100 g^{-1} d.m)	23.5±0.11
Protein (g 100 g^{-1} d. m)	72±0.52
Ash(g 100 g^{-1} d.m)	0.3±0.01

میزان گابا در پودر عصاره 23/5 میلی گرم در صد گرم است که دلیل عمده وجود این ترکیب در پودر مورد بررسی فرایند مالت کردن برنج قهوه ای است. اثر مثبت جوانه زدن دانه غلات از جمله برنج قهوه ای در افزایش بیوسنتز گابا در مقالات متعدد علمی گزارش شده است[1، 5 و10].

3-2- نتایج میزان ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه های ماست

یکی از ترکیبات مهم فراسودمند، ترکیبات فنولی هستند که به دو صورت آزاد و متصل در کنار سایر اجزا وجود دارند[25]. انواع متصل قابلیت جذب مستقیم توسط آنزیم‌های بدن انسان را ندارند [26]. با توجه به اینکه برای فرموله نمودن نمونه‌های ماست از عصاره آبی مالت که حاوی ترکیبات محلول در آب مالت برنج قهوه ای است استفاده شد، بنابراین میزان فنول های آزاد و محلول در ماست حائز اهمیت بود. با توجه به شکل 1، اضافه نمودن عصاره مالت برنج قهوه ای به نمونه‌های ماست سبب افزایش غلظت فنول های محلول شد و همان‌طور که انتظار می‌رفت این افزایش غلظت با زیادتر شدن مقادیر عصاره مالت برنج قهوهای در ماست افزایش یافت. در تحقیقی که روی اثر افزودن چای سبز، سفید و سیاه روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماست پروبیوتیک انجام شد افزایش میزان ترکیبات فنولی در نمونه‌های ماست گزارش شد[24].

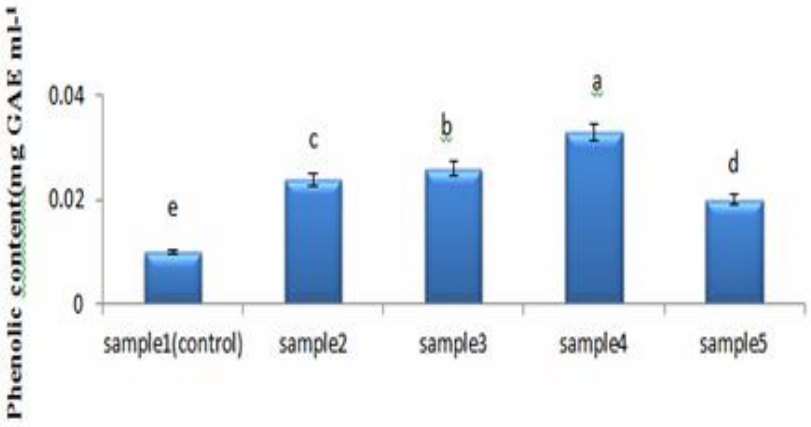

Fig 1 The phenoliccontents of yogurt samples
Different letters indicate on significant difference among samples (p≤0/05)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

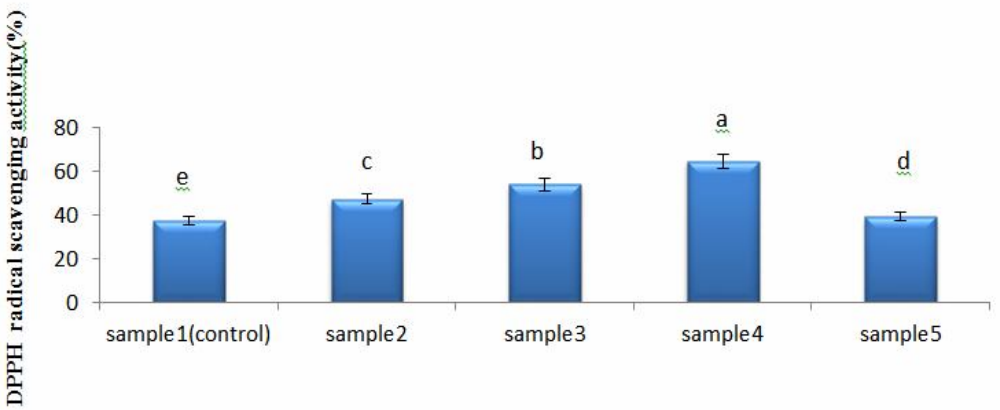

Fig 2 The Antioxidantactivityof yogurt samples.
Different letters indicate on significant difference among samples (p≤0/05)

نکته قابل‌توجه اثر تخمیر همزمان شیر با کشت های آغازگر ماست و *لاکتوباسیلوس ساکئی* بر میزان فنول هابود که باتوجه به شکل 1 احتمالا *لاکتوباسیلوس ساکئی* سبب سنتز برخی ترکیبات فنولی شده چرا که میزان فنول های نمونه تخمیر شده با کشت های آغاز گر و *لاکتوباسیلوس ساکئی* (نمونه 5) بالاتر از نمونه شاهد است، همچنین مطابق نظر کورهونن(2009) پروتئولیز پروتئین‌های شیر ممکن است سبب آزاد شدن آمینواسید های با زنجیرهای جانبی فنولی مثل تیروزین شود و مقدار ترکیبات فنولی کل را افزایش دهد [27]، به علاوه متابولیسم میکروبی ترکیبات فنولی و همچنین تولید فنولیک اسیدهای جدیددر طی فرآیند اسیدی شدن ماست به عنوان عامل احتمالی افزایش ترکیبات فنولی گزارش شده است[28]. با توجه به این استدلال، بالاتر بودن میزان ترکیبات فنولی نمونه 5 که فاقد عصاره مالت برنج قهوه ای و دارای *لاکتوباسیلوس ساکئی* علاوه بر کشت های آغازگرماست می‌باشد در مقایسه با کنترل می‌تواند مربوط به سنتز ترکیبات فنولی در اثر متابولیسم میکروبی باشد. از سوی دیگر بالاتر بودن ترکیبات فنولی ماست‌های حاوی عصاره مالت نسبت به نمونه‌های شاهد و 5 را می‌توان به بالا بودن ترکیبات فنولی عصاره مالت و سنتز متابولیت های فنولی توسط *لاکتوباسیلوس ساکئی* نسبت داد. با توجه به اینکه بسیاری از ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند ظرفیت مهار رادیکال دی پی پی اچ فنول های نمونه های ماست ارزیابی شد که بر اساس نتایج (شکل2) با افزایش درصد عصاره مالت قدرت مهار رادیکال دی پی پی اچ افزایش یافت که با توجه به میزان ترکیبات فنولی نمونه‌ها قابل انتظار بود. نکته قابل توجه تشابه قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه شاهد و نمونه 5 می باشد و می‌توان نتیجه گرفت که عمده قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ماست نشاءت گرفته از عصاره اضافه شده است. در تحقیقی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماست تهیه شده از سویا و گردوی آمریکایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر این ماست نسبت به نمونه شاهد به وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره گردو نسبت داده شده است [29].

3-3- نتایج تغییرات میزان گابادرنمونه های ماست

با توجه به شکل 3 مقدار گابا در بین نمونه ها با یکدیگراختلاف معنی‌داری نشان داد($p\leq0/05$). تیمارهای شاهد و 5 همان طور که انتظار می رفتگابا نداشتند ولی افزودن عصاره مالت برنج قهوهای به فرمول ماست سبب بالا رفتن میزان گابا شد. بالاترین مقدار گابا در نمونه حاوی 100 میلی لیتر عصاره مالت برنج قهوهای مشاهده شد و افزایش درصد عصاره مالت سبب افزایش معنی دار گابا در نمونه های ماست گردید($p\leq0/05$). در تحقیق حاضر افزودن عصاره مالت برنج قهوه ای در مقادیر 50، 75 و 100 میلی لیتر به فرمول ماست سبب افزایش معنی‌دار میزان گابا شد، به طوریکه نمونه‌های ماست به ترتیب دارای حدود1/17، 3/33 و 5/63 میلی گرم در صد گرم ماده خشک گابا بودند. طبق تحقیقات هیروشی(2005)، عصاره مالت برنج قهوه ای حاوی مقادیر زیادیگاباست زیرا در طی جوانه زدن، گلوتامیک اسید به کمک آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز تبدیل به گابا می شود. فرآیند خیساندن دانه، فعالیت گلوتامات دکربوکسیلاز را تحریک

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]
[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

میکنند که بازمان جوانه زنی افزایش میابد. گلوتامات دکربوکسیلاز تبدیل گاما- دکربوکسیلاسیونال -گلوتامیک اسید را به کربن دی اکسیدوگاما آمینوبوتیریک اسید کاتالیز مینماید[30]. در بسیاری از مقالات گابا مسبب تسهیل بقای سلول‌ها از طریق حفظ pH سلول حتی در شرایط اسیدی شناخته شده، زیرا گلوتامات دکربوکسیلاز یون H^+ را برای تولید گابا مصرف می‌کند. به‌طور مشابه ریزسازواه های موجود درفراورده های لبنی تخمیری مثل ماست که دارای مقادیر بالایی گابا و فعالیت زیاد گلوتامات دکربوکسیلاز هستند قادر به ماندگاری در سیستم گوارشی بوده و ممکن است دارای ویژگی مقاومت در برابر شرایط اسیدی باشند[1]. در ماست تولید شده با عصاره مالت سویا و باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* مقدار گابا 42/46 میلی گرم در صد گرم ماده خشکگزارش شده که البته با توجه به منبع گیاهی و میکروارگانیسم های به کار برده شده قابل مقایسه با تحقیق حاضر نمی باشد و از سوی دیگر غلظت بالای گابای تولید شده در تحقیق مورد اشاره بسیار بالاست و نمی توان آن را برای مصرف عموم و بهره مندی از مزایای آن توصیه نمود.

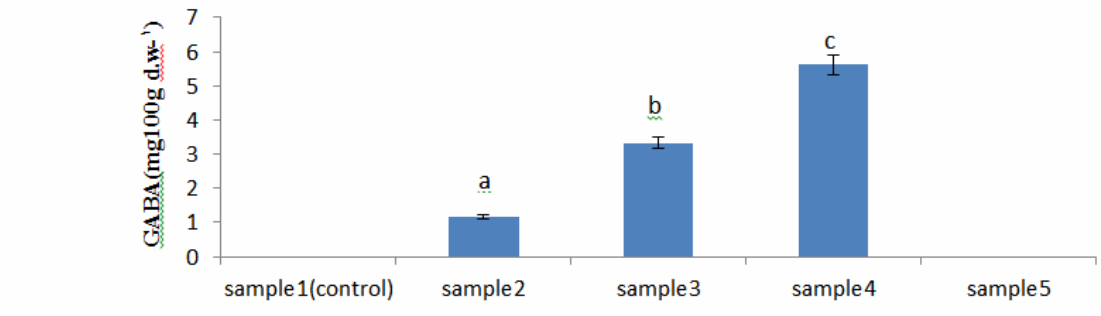

Fig 3 The GABA content of yogurt samples.
Different letters indicate on significant difference among samples (p≤0/05)

3-4- نتایج بررسی تغییرات پروفایل آمینواسید

در بررسی تغییرات میزان آمینواسیدهای نمونه های ماست و پودر عصاره مالت برنج قهوه ای (جدول4) در تمام نمونه ها، بالاترین میزان آمینواسیدهای غیرضروری مربوط به گلوتامیک اسید و بالاترین غلظت آمینواسیدهای ضروری به ترتیب مربوط به لیزین و ترئونین بود.میزان آلانین در نمونه‌های حاوی عصاره مالت برنج قهوه ای نسبت به نمونه شاهد بالاتر بود. در مطالعات پیشین افزودن کیتوزان و گلوتامیک اسید به برنج قهوه ای در حال جوانه زدن عامل افزایش غلظت آلانین گزارش شده است [31] که با نتایج این تحقیق در یک راستا است، زیرا در تحقیق حاضر نیز برای خیساندن از محلول گلوتامیک اسید استفاده شده است. به طور کلی با توجه به سهم کم پروتئین عصاره مالت در فرمول نمونه های ماست، تغییر غلظت آمینواسیدها را نمی توان به میزان پروتین عصاره مالت نسبت داد و بیشتر تغییرات پروفایل آمینو اسید نمونه ها مربوط به تاثیرات تخمیر هم زمان شیر توسط کشت های آغاز گر ماست و *لاکتوباسیلوس ساکئی* است، طوری که با توجه به جدول 2 تغییرات اندک پروفایل آمینواسید در نمونه شاهد و مشاهده می‌شود که دلیل آن مصرف پروتئین ها در اثر تخمیر است. در ماست سویای تولید شده توسط پارک و اه (2007) توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتارم*، *لاکتوباسیلوس برویس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و عصاره مالت سویا افزایش معنادار سرین مشاهده و غلظت سایر آمینواسیدها نیز نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد که دلیل آنرا می‌توان به متفاوت بودن ترکیب پروتئین مالت سویا با عصاره مالت برنج قهوه ای وتفاوت در نوع کشت های آغاز گر مورد استفاده نسبت داد [1].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]
[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

Table 2 The amino acid profile of yogurt samples

Amino acid(mg.100g^{-1})	Sample1(control)	Sample2	Sample3	Sample4	Sample5	GBR
Lysine	16.99	10.58	6.6	8.75	15	1960
Histidine	7.6	4.11	8	5./62	7.5	870
Arginine	3.8	3.5	6	4.37	5	4312
Aspartic acid	3.07	4.11	4	3.75	5.8	4451
Threonine	11.58	9.41	8.6	8.12	12.5	1999
Serin	6.15	2.35	3.3	1.87	5	3000
Glutamic acid	31.53	19.41	21.33	20.62	24.16	8790
Glysine	10	5.8	8	6.8	8.33	2346
Alanine	11.53	12.35	13.33	13.75	19.66	2320
Cysteine	20	14.70	14.66	15	20	940
Valine	1.5	2.35	1.3	1.87	3.3	4156
Methionine	4.6	3.52	3.33	3.12	3.3	1960
Isulosine	3.07	2.35	-	2.5	2.5	2150
Leucine	3.8	1.76	2.66	3.12	4.16	4870
Tyrosine	10	5.2	7.33	7.5	7.5	3655
Phenylalanine	9.2	6.4	6.66	8.12	10	3245
Tryptophan	4.6	2.9	3.3	-	3.3	1140
Proline	0.53	0.29	0.33	0.25	0.5	1890

3-5- نتایج آزمون حسی

بر اساس جدول 5، در بررسی آماری شاخص های حسی تفاوت معنی داری بین نمونه شاهد و نمونه 5مشاهده نشد(p>0/05). بین نمونه های حاوی عصاره مالت بیشترین امتیاز مربوط به نمونه حاوی 50 میلی لیتر عصاره بود.جهت نتیجه گیری جامع تر، میزان پذیرش کلی نمونه ها نیز ارزیابی شدکه بالاترین پذیرش مربوط به نمونه حاوی 50 میلی لیتر عصاره مالت بود.

Table 3 Sensory Characteristics of yogurt Samples

sample	Taste	Texture	Appearance	Spoon ability	Total acceptability
Sample1(control)	3.8±0.37 [a]	3.7±	3.8±0.31 [a]	3.9±	3.7±0.41 [a]
Sample2	2.7±	2.7±	2.6±	2.6±	2.7±0.57 [b]
Sample3	1.6±	1.6±	1.5±	1.5±	1.6± 0.50 [c]
Sample4	0.95±	0.95±	0.95±	0.95±	0.95±0.39[d]
Sample5	3.7±0.47 [a]	3.7±	3.7±0.44 [a]	3.7±0.41 [a]	3.7±

mean±SD

Different letters on each column indicates on significant difference among samples (p≤0/05)

4-نتیجه گیری کلی

استفاده توام از عصاره مالت برنج قهوه ای و باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* سبب افزایش میزان ترکیبات فنولی محلول و ظرفیت آنتی اکسیدانی در ماست های تولیدی شد. افزایش معنی دار غلظت گابا با افزایش درصد عصاره مالت برنج قهوه ای در ماست ها مشاهده شد. استفاده از *لاکتوباسیلوس ساکئی* به تنهایی و در عدم حضور عصاره مالت سبب افزایش سنتز ترکیبات فنولی محلول و قدرت مهار رادیکال آزاد در ماست در مقایسه با نمونه شاهد شد ولی اثری بر سنتز گابا نداشت. با توجه به نتایج، امکان تولید ماست فراسودمند تقویت شده با گابا، ترکیبات فنولی و دارای قدرت آنتی اکسیدانی به کمک عصاره مالت برنج قهوه‌ای و *لاکتوباسیلوس ساکئی* وجود دارد.

5- منابع

[1] Park, K.B. andOh, Sh. 2007. Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. Bioresource Technology. 98: 8. 1675–1679.

[2] Mody, I., Dekoninck, Y., Otis, T.S. andSoltesz, I. 1994. Bringing the cleft at

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

Production of a wheat-based fermented rice enriched with γ-amino butyric acid using *Lactobacillusplantarum MNZ* and its antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. Journal of Functional Foods, 16: 194-203.

[13] Villegas, M. J., Brown, L., Giori, G. S. and Hebert, E. M. 2016. Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis CRL 1942*, isolated from quinoa sourdough. LWT. 67: 22-26.

[14] Saraphanchotiwitthaya, A. and Sripalakit, P. 2018.Production of γ-aminobutyric acid from red kidney bean and barley grain fermentation by *Lactobacillus brevis TISTR 860*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 16: 49-53.

[15] Shan, Y., Man, C. X., Han, X., Li, L., Guo, Y. et al. 2015. Evaluation on improved γ-aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. Journal of Dairy Science, 98: 1-12.

[16] Eisenbach, L., Geissler, A. J., Ehrmann, M. A. and Vogel, R.F. 2019. Comparative genomics of *Lactobacillus sakei* supports the development of starter strain combinations. Microbiological Research, 221: 1-9.

[17] Gao, Y., Li, D. and Liu, X. 2014. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei C2* as starter culture in fermented sausages. Food Control, 35: 1-6.

[18]Chaillou, S., Christieans, S., Rivollier, M., Lucquin, I., Champomier-Vergès, M. C. and Zagorec, M. 2014. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. Meat Science, 97(3): 332-338.

[19] Quinto, E. J., Marín, J. M. and Schaffner, D.W. 2016. Effect of the competitive growth of *Lactobacillus sakei MN* on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes Scott A* in model meat gravy. Food Control, 63: 34-45.

[20] Patil, S. B. and Khan, M. 2011. Germinated brown rice as a value added rice product: A review. Journal of Food Science and Technology. 48: 6. 661-667

[21] Seki, T., Nagase, R., Torimitsu, M., *et al* . 2005. Insoluble fiber is a major constituent responsible for

lowering the post-prandial blood glucose concentration in the pre-germinated brown rice. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 28: 8.1539-1541.

GABA synapses in the brain. Trends in Neurosciences.17:12. 517–525.

[3] Satya Narayan, V. and Nair, P.M. 1990. Metabolism enzymology and possibleroles of 4-aminobutyrate in higher plants. Phytochemistry. 29: 367–375.

[4] Imam, M.U., Azmi, N.H., Bhanger, M.I., Ismail, N. and Ismail, M. 2012. Antidiabetic properties of germinated brown rice: A systematic reviewEvidenceBased complementary and Alternative Medicine.32: 1-12.

[5] Patil, S. B. and Khan, M. 2011. Germinated brown rice as a value added rice product: A review. Journal of Food Science and Technology. 48: 6. 661-667.

[6] Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H. andYamori, Y. 2004. Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. The British Journal of Nutrition. 92: 3. 411–417.

[7] Illupapalayam, V.V., Smith, S.C. andGamlath, SH. 2014. Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yogurt with spices. LWT-Food Science and Technology.55: 255-262.

[8] Aoki, H., Furuya, Y., Endo, Y. and Fujimoto, K. 2003. Effect of gamma – aminobutyric acidenriched tempeh-like fermented soybean(GABA-tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 67: 1806–1808.

[9] Brown, A.W. andShelp, B.J. 1997. The metabolism and functions of gamma aminobutyric acid. Plant Physiology.115: 1. 1–5.

[10] Chen, H.H., Chang, H.C., Chen, Y.K., Hung, C.L., Lin, S.Y. and Chen, Y.S. 2016. An improved process for high nutrition of germinated brown rice production: Low-pressure plasma. Food Chemistry. 191: 120-127.

[11] Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, Sh., Momose, H. and Kimura, T. 2005. Production of γ-aminobutyric acid by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods**.** Food Microbiology, 22 (6): 497-504.

[12] Zareian, M., Oskoueian, E., Forghani, B.and Ebrahimi, M. 2015.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

[22] Illupapalayam, V. V., Smith, S.C. and Gamlath, SH. 2014. Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yogurt with spices. LWT-Food Science and Technology.55: 255-262.

[23] Culea,M., Lordache, A. and Horj, E. 2016. GC-MS methods for amino acids determination in different biological extracts. Bulletin UASVM Agriculture,213-222.

[24]Muniandy, P., Shori, A.B. and Salihin, A. 2016. Influence of green white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. Food Packaging and Shelf life. 8:1-8.

[25] Naczk, M. and Shahidi, F.1989.The effect of methanol–ammonia–water treatment on the content of phenolic acids of canola. Food Chemistry. 31: 159–164.

[26] Vitaglione, P. Napolitano, A. and Fogliano, V. 2008. Cereal dietary fiber: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. Trends in Food Science & Technology. 19: 9. 451–463.

[27] Korhonen, H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods. 1: 177-187.

[28] Ito, Y., Shen, M., Kise, M., Hayamizu, K., Yoshion, G., Yoshihara, R. and Yokoyama, J.2005. Effect of pre-germinated brown rice on postprandial blood glucose and insulin level in subjects with hyperglycemia. Food Chemistry. 12:80-84.

[29] Ye, M., Ren, L., Wu, Y., Wang, Y. and Liu, Y. 2013. Quality characteristics and antioxidant activity of hickory-black soybean yogurt. Food Science and Technology.51: 1. 314-318.

[30] Hiroshi, C. 2005. Attraction of germinated brown rice and contribution to rice consumption expansion. Workshop and Conference on Rice in the World at Stake. 67–70.

[31] Oh, Ch. and Oh, Sh. 2004. Effects of germinated brown rice extract with enhanced levels of GABA of cancer cell proliferation and apoptosis. Journal of Medicinal Food. 7: 1. 19-23.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]

Production of gamma-aminobutyric acid enriched yogurt by using *Lactobacillus sakei* and brown rice malt extract

Jafari, N. [1], Saremnezhad, S. [2*]

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran-Iran

(Received: 2019/04/18 Accepted:2019/12/23)

Gamma-aminobutyric acid orGABA is a non-protein functional amino acid. It functions as an inhibitory neurotransmitter that is involved in the regulation of cardiovascular functions, such as blood pressure and heart rate and also plays role in the sensations of pain, anxiety, stimulation of insulin secretion from the pancreas and preventing diabetes. Fermentation and germinating of cereal grains are of biosynthetic methods for GABA production. This study aimed to investigate the production of GABA enriched yogurt by using of*Lactobacillus sakei*and brown rice malt extract. In this regard, brown rice malt extract was added to low-fat milk in 0, 50,75 and 100 ml quantities and set yogurts were produced after addition of skimmed milk powder and inoculation of commercial yogurt starters and*Lactobacillus sakei*,then the concentrations of GABA, phenolic compounds, amino acids, the antioxidant capacity, and sensorial characteristics were evaluated.
According tothe results, yogurts that were produced by brown rice malt extract contained GABA. The highest GABA content (5.62 mg/100 g d. w) was observed in yogurt with 100 ml brown rice malt extract. Using brown rice malt extract and *Lactobacillus sakei*caused significant increasing ($p \leq 0/05$) of phenolic compounds and their antioxidant capacities in yogurt samples compared to control. In amino acid profile analysis, glutamic acid showed the highest concentration and lysine was the highest among essential amino acids. In sensory evaluation tests, the sample with 50 ml brown rice malt extract, had the highest overall acceptability. Regarding to the results, production of GABA enriched functional yogurt containing phenolics and antioxidant compounds by using of brown rice malt extract and fermenting with *Lactobacillus sakei*and general yogurt starter cultures is feasible.

Keywords: Yogurt, Functional, Gamma-aminobutyric acid, *Lactobacillus sakei*,Brown rice malt extract.

*Corresponding Author E-Mail Address: solmazsaremi@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-12]

[DOI: 10.29252/fsct.17.01.09]